

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ ГРЕЧИХИ ПОСЕВНОЙ

© 2011 М.М. Анисимова, В.А. Куркин, В.М. Рыжов

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 17.05.2011

К перспективным источникам получения флавоноидных препаратов, в том числе рутина, относится гречиха посевная (*Fagopyrum sagittatum* Gilib.), широко культивируемая в Российской Федерации, однако по-прежнему остается нерешенной проблема стандартизации сырья данного растения. Предложены новые подходы к стандартизации травы гречихи посевной. Разработаны методики ВЭЖХ-анализа сырья гречихи посевной и субстанции «Рутин», которые рекомендованы для включения в нормативную документацию.

Ключевые слова: *гречиха посевная, Fagopyrum sagittatum Gilib., трава, ангиопротекторы, рутин, флавоноиды, стандартизация*

В настоящее время основным источником получения рутина являются бутоны софоры японской, однако в Российской Федерации отсутствует промышленная сырьевая база данного растения, поэтому потребность в этом ценном флавоноидном ангиопротекторе удовлетворяется за счет импорта. Перспективным источником получения рутина является гречиха посевная (*Fagopyrum sagittatum* Gilib.), широко культивируемая в Самарской области и в РФ в целом. Важнейшим направлением по обоснованию целесообразности использования сырья гречихи посевной является проведение фармакогностических, химико-технологических и аналитических исследований надземной части данного растения. Принимая во внимание то обстоятельство, что до сих пор в литературных источниках и нормативной документации на рутин не сложились единые подходы к анализу, как травы гречихи посевной, так и рутина, представляется актуальным исследование по выбору оптимальных методов анализа сырья данного растения и лекарственной субстанции «Рутин». Одним из селективных методов анализа биологически активных веществ, в том числе флавоноидов, является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Особенностью данного метода является возможность использования его одновременно как в качественном, так и в количественном анализе.

Цель работы: исследование по разработке методик качественного и количественного анализа нового вида лекарственного растительного сырья «Гречихи посевной трава» с применением ВЭЖХ.

Материал и методы. Исследовали образцы надземной части гречихи посевной, культивируемой в Самарской области, а именно: Средне-Волжский филиал ГУ ВИАР (пос. Антоновка), Самарский ботанический сад. Образцы сырья собирали в фазу цветения в 2009 г. Исследовали также образцы субстанции «Рутин», полученные из травы гречихи посевной в лабораторных условиях. В ходе разработки методик качественного и количественного анализа нами анализировалось водно-спиртовое извлечение травы гречихи посевной. При этом было предложено использование в данных методиках государственного стандартного образца (ГСО) рутина.

ВЭЖХ-анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе «Милхром-5» в изократическом режиме (колонка КАХ 6-80-4 № 6 25.01.99, стационарная фаза - «Seracon C₁₈»). Подвижной фазой в анализе служила смесь ацетонитрила и воды в различных соотношениях с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты. Скорость хроматографирования в анализе составляла 0,1 мл/мин, объем вводимой пробы – 5 мкл. Детекцию флавоноидных структур проводили при аналитической длине волны λ_{\max} 360 нм. Для обнаружения возможных сопутствующих веществ использовали дополнительные длины волн: 254; 270; 290; 330 нм.

Результаты и их обсуждение. При выборе аналитической длины волны мы руководствовались данными спектрофотометрических исследований. УФ-спектр рутина имеет 2 максимума поглощения при 256 нм и 362 нм (рис. 1). Поскольку в коротковолновой области обнаруживаются многие

*Анисимова Мария Михайловна, аспирантка
Куркин Владимир Александрович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: vakur@samaramail.ru*

Рыжов Виталий Михайлович, кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: lavr_rvm@mail.ru

фенольные соединения, то наиболее специфичной для анализа рутина в траве гречихи посевной будет длина волны 360 нм с учетом технических возможностей хроматографа (диапазон детектирования 210-360 нм). Спектрофотометрическая методика не позволяет избирательно определять целевое вещество (рутин) в смеси флавоноидных соединений, содержащихся в траве гречихи посевной. Поэтому для решения данной задачи был выбран метод ВЭЖХ, который использован нами для обоснования способа получения рутина.

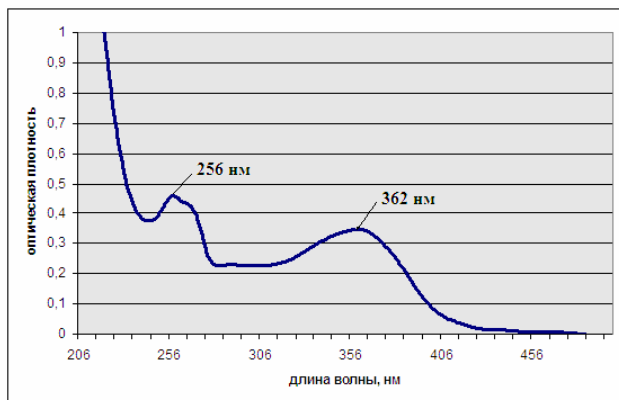


Рис. 1. УФ-спектр раствора рутина

В результате проведенных технологических исследований разработан способ получения рутина. Выход рутина составляет около 1,5-2,0% от массы воздушно-сухого сырья. На начальном этапе нами были проведены ВЭЖХ-исследования полученного образца рутина по подбору оптимальных условий хроматографирования. По результатам ВЭЖХ-анализа образца рутина, полученного из травы гречихи, выявлено присутствие примесного пика с временем удерживания 1,913 мин (рис. 2).

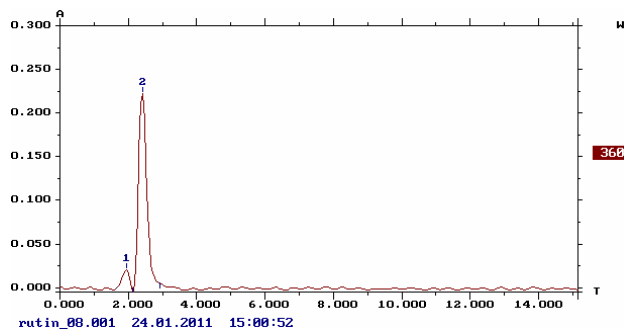


Рис. 2. Хроматограмма образца рутина

Аналогично образцу рутина нами проанализирована трава гречихи посевной. При ВЭЖХ-анализе травы использовали извлечение на 70% спирте этиловом в соотношении 1:1000 (рис. 3). По результатам ВЭЖХ исследований подобраны оптимальные условия хроматографирования, в частности, состав подвижной фазы, представленный ацетонитрилом и водой в соотношении 3:7 с добавлением 1% уксусной кислоты. За аналитическую длину волны приняли $\lambda_{\max} = 360$ нм.

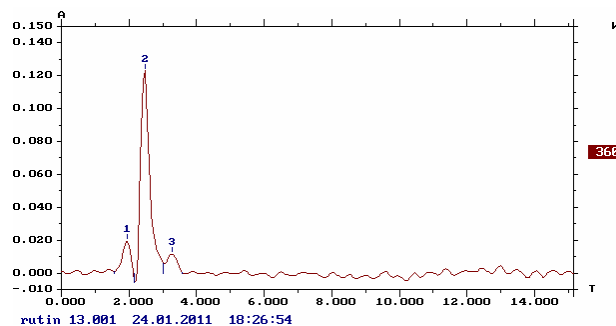


Рис. 3. Хроматограмма водно-спиртового извлечения из травы гречихи посевной

Методика количественного определения рутина в траве гречихи посевной. Около 1 г (точная навеска) воздушно-сухого образца измельченного сырья с размером частиц, проходящих через сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в колбу с притертой крышкой емкостью 100 мл, добавляют 40 мл 70% этилового спирта. Колбу взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г и присоединяют к обратному холодильнику. Экстракцию осуществляют при нагревании на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Извлечение охлаждают, доводят на тарирных весах до первоначальной массы 70% этиловым спиртом и отфильтровывают через бумажный фильтр с красной полосой. 1 мл полученного извлечения (1:40) переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят 70% этиловым спиртом до метки (раствор А). 5 мкл раствора А вводят в хроматограф «Милихром-5» и хроматографируют со скоростью потока 0,1 мл/мин. Детекцию анализируемых веществ проводят при аналитической длине волны λ_{\max} 360 нм. Анализ осуществляют в трех повторностях. Параллельно осуществляют анализ раствора А РСО рутина при длине волны 360 нм. Содержание рутина в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{H \times m_0 \times 2000}{H_0 \times m},$$

где H – значение высоты флавоноидного пика (пик 2 рис. 3) рутина испытуемого раствора; H_0 – высота пика раствора РСО рутина; m – объём аликвоты, г; m_0 – масса РСО рутина, г.

Содержание рутина в траве гречихи посевной находится в диапазоне 2,50-3,70% в зависимости от года сбора и места культивирования.

Примечание: Приготовление раствора государственного стандартного образца рутина. Около 0,025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После растворения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят 70% этиловым спиртом до метки (раствор А).

Таким образом, обоснована целесообразность возможности использования метода ВЭЖХ в качественном и количественном анализе травы гречихи посевной и субстанции «Рутин». При

этом присутствие доминирующего пика рутина (пик 2, рис. 3) является аналитическим эффектом, указывающим на подлинность сырья.

Выводы:

1. Предложен новый вид лекарственного растительного сырья «Гречихи посевной трава» как перспективный источник флавоноидов, в том числе рутина.

2. Разработаны методики качественного и количественного определения рутина в траве гречихи посевной с использованием ВЭЖХ;

3. Разработана методика ВЭЖХ-анализа субстанции «Рутин».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Государственный реестр лекарственных средств. Том I. Официальное издание. – М., 2008. 1398 с.
2. *Анисимова, М.М.* Трава гречихи посевной – новый сырьевой источник ангиопротекторных и антиоксидантных лекарственных средств // Материалы 4-й

Всероссийской с международным участием научно-методической конференции «Фармообразование-2010». Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ, ч. II, научные основы создания новых лекарственных средств. – Воронеж. 2010. С. 34-35.

3. *Арзамасцев, А.П.* Государственные стандартные образцы лекарственных веществ (проект общей фармакопейной статьи) / *А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев, Н.П. Садчикова* // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2000. № 3. С. 24-26.
4. *Самылина, И.А.* Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / *И.А. Самылина, И.А. Баландина* // Фармация. 2004. №2. С. 39-41.
5. *Куркин, В.А.* Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. 1239 с.

RESEARCH THE POSSIBILITY OF USING HIGH EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR STANDARDIZATION OF *FAGOPYRUM SAGITTATUM* HERBS RAW MATERIALS

© 2011 M.M. Anisimova, V.A. Kurkin, V.M. Ryzhov

Samara State Medical University

To perspective sources of reception the flavonoid preparations, including the routine, concerns *Fagopyrum sagittatum* Gilib., widely cultivated in Russian Federation, however still there is unresolved problem of standardization raw materials of the given plant. New approaches to standardization of buckwheat grass are offered. Techniques of HELC-analysis of buckwheat raw materials and substance of "Routines" which are recommended for inclusion in the standard documentation are developed.

Key words: *buckwheat, Fagopyrum sagittatum Gilib., grass, anghioprotectors, routine, flavonoids, standardization*

Mariya Anisimova, Post-graduate Student
Vladimir Kurkin, Doctor of Pharmacy, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Basis of Phytotherapy. E-mail: vakur@samaramail.ru
Vitaliy Pyzhov, Candidate of Pharmacy, Assistant at the Department of Pharmacognosy with Botany and Basis of Phytotherapy. E-mail: lavr_rvm@mail.ru